

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07540

研究課題名（和文）病原真菌カンジダにおける多剤耐性機序の解明とその克服

研究課題名（英文）Elucidation and Overcoming Multidrug Resistance Mechanisms in the Pathogenic Fungus Candida

研究代表者

宮崎 泰可（Miyazaki, Taiga）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：60448496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は病原真菌Candida glabrataにおける多剤耐性機序の解明と新たな抗真菌薬シーズの探索を目的として開始した。C. glabrataのわずか一つのアミノ酸変異によって多剤耐性が誘導されることを見出し、転写調節因子を介した薬剤排出ポンプの活性化およびその細胞内シグナル伝達経路を解明した。また、化合物ライブラリーのスクリーニングで、多剤耐性Candida aurisにも抗真菌活性を示す新規化合物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化や先進医療の発展に伴い免疫不全患者が増加しているため、日和見感染症として発症する真菌症への対策は重要な課題である。しかし、現在臨床現場で使用できる有効な治療薬はきわめて限られており、その上、世界的に薬剤耐性真菌の報告が相次いでいる。本研究課題では、その耐性機序を分子生物学的に解明し、多剤耐性菌にも有効な新規化合物を発見し合成した。これらの研究成果は、既存薬の有効利用や新たな治療戦略の開発に有用な情報をもたらすと考える。

研究成果の概要（英文）：This study was initiated to elucidate the mechanisms of multidrug resistance in the pathogenic fungus *Candida glabrata* and to search for new antifungal drug seeds. We found that a single amino acid mutation in *C. glabrata* induced multidrug resistance and elucidated the activation of the drug efflux pump via a transcriptional regulator and its intracellular signaling pathway. We also identified novel compounds that exhibit antifungal activity against multidrug-resistant *Candida auris* through compound library screening.

研究分野：感染症学

キーワード：抗真菌薬耐性

1. 研究開始当初の背景

臓器移植や各種免疫抑制療法など先進医療の発展に伴い、日和見感染症対策は重要な課題となっている。なかでも、侵襲性カンジダ症は最も発症頻度が高い深在性真菌症の1つであり抗真菌薬治療を受けても死亡率は30-40%と予後不良疾患である。臨床使用が可能な主要抗真菌薬はわずか3系統に限られているなかで、2系統以上に耐性を示す多剤耐性カンジダ (*Candida glabrata* および *Candida auris*) の増加が報告されており、重大な脅威となっている (Pappas PG et al. Nat Rev Dis Primers. 4:18026, 2018)。複数の耐性機序が偶然一つの細胞内で発生したという報告もあるが、全ての多剤耐性株を説明するに至っていない。耐性を克服するためには、まずはその耐性機序を理解する必要がある。さらに、耐性真菌にも有効な抗真菌薬シーズの探索や既存薬の有効利用による新規治療戦略の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、特に薬剤耐性が問題となっている *Candida glabrata* と *Candida auris* に焦点をあて、抗真菌薬耐性化に関連する重要な因子の同定と分子生物学的機序の解明を目指す。さらに、侵襲性カンジダ症の原因真菌として最も頻度が高い *Candida albicans* に加え、薬剤耐性カンジダにも有効な抗真菌薬シーズを探索し、有効な治療戦略の開発につなげるための基礎データの取得を目的とする。

3. 研究の方法

病原真菌カンジダにおける抗真菌薬耐性機序の解明

C. glabrata の標準株を用いて、特定の遺伝子変異の導入、遺伝子欠損株および回復株を作製し、抗真菌薬感受性や病原性を評価する。それらのメカニズムを解明するために、細胞構造解析や網羅的遺伝子発現解析、細胞壁成分解析、各種感染マウスモデルを用いた動物実験等を実施する。

耐性真菌の克服を目指した抗真菌薬シーズの探索

東京大学創薬機構の化合物ライブラリーを用いて、主要な病原性真菌である *C. albicans* と *Aspergillus fumigatus* の標準株に対して抗真菌活性を示す化合物をスクリーニングする。多剤耐性菌に対する増殖抑制効果と殺菌性も検証する。有効な化合物が得られた場合は、構造展開し周辺化合物を評価する。結果に応じて、毒性などの評価を追加施行する。

4. 研究成果

- (1) 臨床的に重要な *C. glabrata* を用いて各種遺伝子の欠損株や過剰発現株などを作製し、セリン/スレオニンプロテインキナーゼである Elm1 が細胞形態や細胞壁成分の恒常性、キャンディン系抗真菌薬など細胞壁ストレスへの抵抗性に重要な役割を担っていること、また、その一方で、この Elm1 が欠損すると *C. glabrata* の病原性が増強することを *Galleria mellonella* 感染モデルで明らかにした。この Elm1 の欠損により、キチン合成酵素や接着関連タンパク質をコードする遺伝子の発現量が増加し、寒天培地や A549 細胞、Caco-2 細胞への接着能が増強したことが、病原性に影響したと

- 考えられた。特に Elm1 のキナーゼ活性が重要であることも明らかにした (Sci Rep. 10(1):9789, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-66620-7)。
- (2) 腸管からの口ランスロケーションによって発症する侵襲性カンジダ症のマウスモデルを作製し、アゾール系抗真菌薬耐性に関与している *C. albicans* *ERG3* 遺伝子欠損株の感染病態や病原性を評価した (Pathogens. 10(1):23, 2020. doi: 10.3390/pathogens10010023)。
 - (3) キャンディン系抗真菌薬カスポファンギンが、溶解液のイオン濃度に依存して、多剤耐性カンジダにも強力な殺真菌作用を発揮することを明らかにした。既存薬の有効利用による新しい治療戦略の開発が期待される (Sci Rep. 10(1):17745, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-74749-8)。
 - (4) *C. glabrata* のわずか一つの遺伝子の一つのアミノ酸変異によって多剤耐性が誘導されることを見出した。その後、DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析とリアルタイム PCR による検証を行い、ある細胞内シグナル伝達経路の転写調節因子が活性化されることによって、薬剤排出ポンプ遺伝子の高発現をきたしていることが明らかとなった。その結果、実際に細胞内薬剤濃度が著明に減少していることをフローサイトメトリー解析で確認した。さらに、これらの関連遺伝子欠損株を作製し、感受性が回復することを確認できたため、薬剤排出ポンプの活性化が一つの機序として関与していると結論付けた。また、免疫沈降法などを活用し、多剤耐性機序に関与している上流の細胞内シグナル伝達経路を同定した。最終年度 (R3 年度) には、播種性カンジダ症のマウスモデルを用いた病原性の検討およびカイコ幼虫の感染モデルを用いた抗真菌薬治療実験を実施した。論文の執筆を進めている。
 - (5) 創薬研究では、東京大学創薬機構の化合物ライブラリーを用いて、主要な病原性真菌である *C. albicans* と *Aspergillus fumigatus* の標準株に対して抗真菌活性を示す化合物をスクリーニングした。ヒット化合物の中から新たに周辺化合物の合成展開を行い、濃度活性、広域性、細胞毒性を評価したところ、今回新たに合成した新規化合物 1-[(E)-[4-(3',4'-dichlorobenxyloxy)phenyl methylidene]amino]-guanidine が最も抗真菌活性と広域性に優れていた。この化合物は、*C. auris* の多剤耐性株に対しても抗真菌活性を示した (ChemistrySelect. 5:1140-1145, 2020. doi: 10.1002/slct.201904380)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hirayama Tatsuuro, Miyazaki Taiga, Sumiyoshi Makoto, Ashizawa Nobuyuki, Takazono Takahiro, Yamamoto Kazuko, Imamura Yoshifumi, Izumikawa Koichi, Yanagihara Katsunori, Kohno Shigeru, Mukae Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 ERG3-Encoding Sterol C5,6-DESATURASE in Candida albicans Is Required for Virulence in an Enterically Infected Invasive Candidiasis Mouse Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 23 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10010023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sumiyoshi Makoto, Miyazaki Taiga, Makau Juliann Nzembi, Mizuta Satoshi, Tanaka Yoshimasa, Ishikawa Takeshi, Makimura Koichi, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel and potent antimicrobial effects of caspofungin on drug-resistant Candida and bacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74749-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ito Yuya, Miyazaki Taiga, Tanaka Yutaka, Suematsu Takashi, Nakayama Hironobu, Morita Akihiro, Hirayama Tatsuuro, Tashiro Masato, Takazono Takahiro, Saijo Tomomi, Shimamura Shintaro, Yamamoto Kazuko, Imamura Yoshifumi, Izumikawa Koichi, Yanagihara Katsunori, Kohno Shigeru, Mukae Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Roles of Elm1 in antifungal susceptibility and virulence in Candida glabrata	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66620-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nana Nakada-Motokawa, Taiga Miyazaki, Satoshi Mizuta, Yoshimasa Tanaka, Tatsuuro Hirayama, Takahiro Takazono, Tomomi Saijo, Kazuko Yamamoto, Yoshifumi Imamura, Koichi Izumikawa, Katsunori Yanagihara, Koichi Makimura, Kohsuke Takeda, Shigeru Kohno, and Hiroshi Mukae	4. 巻 -
2. 論文標題 Design and Synthesis of a Class of Compounds That Inhibit the Growth of Fungi Which Cause Invasive Infections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemistrySelect	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/slct.201904380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎泰可
2. 発表標題 ウイルス感染と侵襲性真菌症
3. 学会等名 第91回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 第64回日本感染症学会中日本地方会学術集会, 第69回日本化学療法学会西日本支部總會
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎泰可
2. 発表標題 深在性真菌症の予防と治療 Up to date
3. 学会等名 日本医真菌学会總會
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎泰可
2. 発表標題 呼吸器感染症治療における新たなトピックス
3. 学会等名 第94回日本感染症学会總會
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎泰可
2. 発表標題 遺伝子診断法の現状と今後の展望
3. 学会等名 第94回日本感染症学会總會
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎泰可
2. 発表標題 侵襲性カンジダ症におけるエンピリック治療
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎泰可
2. 発表標題 医師が考える深在性真菌症診断・治療のベストプラクティス
3. 学会等名 第68回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎泰可
2. 発表標題 エルゴステロール合成酵素阻害薬
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田奈々、宮崎泰可、高園貴弘、島村真太郎、西條知見、山本和子、今村圭文、泉川公一、柳原克紀、榎村浩一、河野茂、迎寛
2. 発表標題 化合物ライブラリーを用いた抗真菌薬のハイスループットスクリーニング
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤裕也、宮崎泰可、中山浩伸、田中大、高園貴弘、西條知見、島村真太郎、山本和子、今村圭文、泉川公一、柳原克紀、河野茂、迎寛
2. 発表標題 病原真菌Candida glabrataにおけるカルシニューリン 関連分子EIm1の機能解析
3. 学会等名 真菌症フォーラム2019学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎泰可
2. 発表標題 深在性真菌症の治療 - 基礎研究からのトランスレーション -
3. 学会等名 真菌症フォーラム2019学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住吉誠、宮崎泰可、水田賢志、田中義正、石川岳志、榎村浩一、高園貴弘、西條知見、山本和子、今村圭文、泉川公一、柳原克紀、河野茂、迎寛
2. 発表標題 カンジダ属および多剤耐性菌に対するカスポファンギンの新たな抗微生物活性
3. 学会等名 第63回医真菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	榎村 浩一 (Makimura Koichi) (00266347)	帝京大学・公私立大学の部局等・教授 (32643)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 大 (Tanaka Yutaka) (00613449)	東北医科薬科大学・薬学部・助教 (31305)	
研究分担者	中山 浩伸 (Nakayama Hironobu) (40369989)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授 (34104)	
研究分担者	水田 賢志 (Mizuta Satoshi) (50717618)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教 (17301)	
研究分担者	田中 義正 (Tanaka Yoshimasa) (90280700)	長崎大学・先端創薬イノベーションセンター・教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関